

10/526213  
PCT/JP 03/11352

Rec PCT/PTO 04 MAR 2005  
05.09.03

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2 0 0 2 年 9 月 5 日

REC'D 23 OCT 2003  
WIPO PCT

出 願 番 号  
Application Number: 特 願 2 0 0 2 - 2 5 9 8 8 9  
[ST. 10/C]: [ J P 2 0 0 2 - 2 5 9 8 8 9 ]

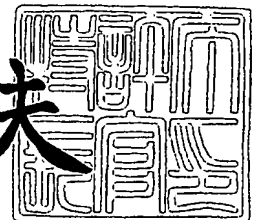
出 願 人  
Applicant(s): 独立行政法人産業技術総合研究所  
学校法人片柳学園

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 3 年 1 0 月 9 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 SEN-A0204

【提出日】 平成14年 9月 5日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 27/447

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府堺市御池台1丁28番61号

【氏名】 平塚 淳典

【発明者】

【住所又は居所】 東京都世田谷区北沢1-12-6

【氏名】 矢野 和義

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区美しが丘2-54-10

【氏名】 軽部 征夫

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県土浦市中荒川沖町7-16 コーポ荒川沖201号

【氏名】 蔡 碩文

【特許出願人】

【住所又は居所】 東京都世田谷区北沢1-12-6

【氏名又は名称】 矢野 和義

【特許出願人】

【識別番号】 591086706

【氏名又は名称】 軽部 征夫

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 電気泳動分析方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 次の工程を含む物質の電気泳動方法。

- a) 電気泳動媒体に接する表面がプラズマ重合膜でコートされている基材に保持された電気泳動媒体に分析すべき物質を加える工程、および
- b) 電気泳動媒体に電圧を印加する工程

【請求項 2】 プラズマ重合膜が、ヘキサジエン、ヘキサメチルジシロキサン、およびアセトニトリルからなる群から選択されるいずれかのモノマー物質の重合によって形成されている請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 電気泳動すべき物質が蛋白質である請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】 電気泳動の原理が、等電点電気泳動である請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】 基材がガラスである請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】 電気泳動用媒体が接触する表面をプラズマ重合膜でコートした電気泳動分析用基材。

【請求項 7】 次の要素で構成される電気泳動分析装置。

- a) 電気泳動用媒体が接触する表面をプラズマ重合膜でコートした電気泳動媒体を保持するための基材、および
- b) a) 基材に保持された電気泳動用媒体に電圧を印加するための電極

【請求項 8】 基材表面にプラズマ重合膜を形成する工程を含む、電気泳動分析用基材の製造方法。

【請求項 9】 基材表面にプラズマ重合膜を形成する工程を含む、電気泳動分析用基材の表面を改質する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、電気泳動分離に関する。

【0002】

**【従来の技術】**

電気泳動現象を利用して試料成分を分離する研究は、古くは寒天ゲルを充填したガラス管の中に試料成分を流し、分離する方法や、試料中の成分をゾーンとして分離を試みた蛋白質の分離実験等がある(文献：1/T. B. Coolidge, J. Biol. Chem., 127, 551, 1939)。このような長い電気泳動の歴史の中で種々の形態の電気泳動が登場した。さらには、自由溶液中で極めて細いキャピラリーを用いる電気泳動(CE)法も開発された(文献：2/F. E. P. Mikkers, F. M. Everaerts, Th. P. E. M. Veerheggen, J. Chromatogr., 169, 11, 1979)。

CE法は優れた分離が行えるばかりでなく、再現性の高い検出や定量を行うことができる。CEはオンキャピラリー検出であり、さらに自由溶液中で検出を行えばバックグラウンドの吸収が均一となる。そのため検出の再現性は従来の電気泳動法と比較して圧倒的に優れ、信頼性の高い定量も可能である。

**【0003】**

しかし、現在のCEは細いキャピラリー管が使用されている。現在までに汎用的に利用され、それなりの高性能が得られるスラブゲルを用いた2次元電気泳動法のような2次元構造をCEにそのままの状態で作製し、利用することは技術上困難である。また多種多様な蛋白質を分離、検出するためには、様々な分離、分析手段を組み合わせることが必要とされる。そのためには多量の蛋白質が必要となる場合が多い。しかし蛋白質は非常に微量にしか存在しないことがあり、多種類の蛋白質検出は困難を伴うことがある。

**【0004】**

一方、微量な蛋白質を検出するためには高感度な検出法や微小なデバイスを作製することが要求される。しかし現実には、従来の手作業による作製法ではmm以下のサイズのデバイス作製は非常に困難である。また作製されたデバイスは、一品、一品性能が異なる。つまり性能にばらつきが生じ易いため、歩留まりが悪くなる恐れがあった。

**【0005】**

蛋白質のみならず、核酸のような成分の分離においても、電気泳動分離は重要な技術である。核酸の分離においても、蛋白質と同様に、微小なデバイスによる

分離が実現できれば、分析に要する試料の微量化や時間の短縮効果を期待できる。

#### 【0006】

微量な試料を高精度に分離することができるデバイス開発のためには、マイクロマシーニング技術や、半導体加工技術の応用が必要と考えられた。マイクロマシーニング技術とは、微小なチップの上に、流路、流路内の液体の流れを制御する構造、あるいは流路内における温度条件の制御機構等を構築するためのテクノロジーである（文献：3／江刺正喜、マイクロマシン、応用物理、60、1991；文献：4／P. N. Gilles, D. J. Wu, C. B. Foster, P. L. Dillon, S. J. Chanock, Nature Biotech., 17, April, 1999；文献：5／GeneChip systems, Affymetrix Inc. 3380 Central Expressway Santa Clara, CA 95051）。また半導体加工技術とは、フォトリソグラフやエッチング加工によって、基板表面に微細な構造を構築するためのテクノロジーである（文献：6／A. Heuberger (ed.), Micro-mechanics, Springer-Verlag, Berlin, 1989；文献：7／古川静二郎、浅野種男、超微細加工入門、オーム社、1989）。

#### 【0007】

これらのテクノロジーを利用したデバイスの作製に用いられる基材の中で、ガラスは最も一般的な素材の一つである。ところで、ガラスキャピラリーを利用して電気泳動を行うと、材質のガラスと溶液の接する内壁が負に帯電し、電気浸透流は陽極から陰極へ向かって流れる。このような条件下では、単方向のゾーン電気泳動のみが可能である。したがって試料中に陽イオン成分が含まれていた場合は、陽イオンの移動時間が極端に短くなり、陽イオン成分の分離は難しくなる。つまりガラス製の基材を用いて作製されたデバイスは、このようなガラスキャピラリーにおいて指摘された問題点と共通の課題を有すると予測される。

#### 【0008】

ガラス表面の帯電状態を制御することができれば、電気泳動の条件を必要に応じて調節できる。しかし、電気泳動媒体が接触する基材表面の帯電条件を制御する電気泳動方法は知られていない。

#### 【0009】

更に、中性成分は電荷をもたないため、単方向のゾーン電気泳動では分離できない。中性成分の蛋白質の分離には、等電点電気泳動法が有効である。等電点電気泳動法には、キャピラリー内壁の改質が必要である。しかし容易に実施することができ、良好な改質表面を与える表面改質方法は知られていない。

#### 【0010】

【文献：1】T. B. Coolidge, J. Biol. Chem., 127, 551, 1939

【文献：2】F. E. P. Mikkers, F. M. Everaerts, Th. P. E. M. Veerheggen, J. Chromatogr., 169, 11, 1979

【文献：3】江刺正喜、マイクロマシン、応用物理、60、1991

【文献：4】P. N. Gilles, D. J. Wu, C. B. Foster, P. L. Dillon, S. J. Chanock, Nature Biotech., 17, April, 1999

【文献：5】GeneChip systems, Affymetrix Inc. 3380 Central Expressway Santa Clara, CA 95051

【文献：6】A. Heuberger (ed.), Micro-mechanics, Springer-Verlag, Berlin, 1989

【文献：7】古川静二郎、浅野種男、超微細加工入門、オーム社、1989

#### 【0011】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、電気泳動媒体が接触する基材表面の様々な性質を制御しうる電気泳動分離方法とデバイスの提供を課題とする。

#### 【0012】

##### 【課題を解決するための手段】

ガラス基材表面の改質のためには、たとえばアクリルアミドを使った化学修飾によるガラス表面の中性化が考えられる。本発明者らは、シランカップリングを介したアクリルアミドの化学修飾化を試みた。

#### 【0013】

しかしこの方法はシランカップリング剤として導入された親水性基が安定でなく、中性からアルカリ性溶液中で徐々に改質表面が剥離する問題を生じる可能性がある。さらに試料として利用する予定の蛋白質の中には、電荷を帯びた物質と

静電的に容易に結合する物質も存在する可能性がある。吸着性の物質がガラス内壁に吸着した場合、キャピラリー内壁の帯電状態（ $\zeta$  電位）が変化する。その結果として電気浸透流が変動し、定量的な蛋白質の分離分析が難しくなる。

#### 【0014】

また化学修飾法を利用した内壁修飾法は、ピンホール等の欠陥が生じ、修飾膜の膜質や膜厚の制御が難しい等の問題がある。加えて化学修飾法は逐次加工法である。そのため、均等な品質を維持しながら大量のデバイスを作製することは困難である。

#### 【0015】

本発明者らは、電気泳動媒体が接触する基材表面の種々の条件を制御するための技術として、プラズマ重合膜に着目した。プラズマ重合膜は極めて均質な膜を任意の形状の基材表面に形成することができる。また、モノマー物質の選択によって、いろいろな性状を有する膜を容易に形成することができる。更に、多くの基材表面に均質な膜を形成することができる。

#### 【0016】

本発明者らは、実際に、プラズマ重合膜でコートした基材を利用して電気泳動分離を試みた。そして、プラズマ重合膜が電気泳動溶媒体が接触する基材の表面改質技術として有用であることを見出し本発明を完成した。すなわち本発明は、以下の電気泳動分離方法、およびそのためのデバイスに関する。

〔1〕 次の工程を含む物質の電気泳動方法。

- a) 電気泳動媒体に接する表面がプラズマ重合膜でコートされている基材に保持された電気泳動媒体に分析すべき物質を加える工程、および
- b) 電気泳動媒体に電圧を印加する工程

〔2〕 プラズマ重合膜が、ヘキサジエン、ヘキサメチルジシロキサン、およびアセトニトリルからなる群から選択されるいずれかのモノマー物質の重合によって形成されている〔1〕に記載の方法。

〔3〕 電気泳動すべき物質が蛋白質である〔2〕に記載の方法。

〔4〕 電気泳動の原理が、等電点電気泳動である〔3〕に記載の方法。

〔5〕 基材がガラスである〔1〕に記載の方法。



〔6〕電気泳動用媒体が接触する表面をプラズマ重合膜でコートした電気泳動分析用基材。

〔7〕次の要素で構成される電気泳動分析装置。

a) 電気泳動用媒体が接触する表面をプラズマ重合膜でコートした電気泳動媒体を保持するための基材、および

b) a) 基材に保持された電気泳動用媒体に電圧を印加するための電極

〔8〕基材表面にプラズマ重合膜を形成する工程を含む、電気泳動分析用基材の製造方法。

〔9〕基材表面にプラズマ重合膜を形成する工程を含む、電気泳動分析用基材の表面を改質する方法。

#### 【0017】

##### 【発明の実施の形態】

本発明は、次の工程を含む物質の電気泳動方法に関する。

a) 電気泳動媒体に接する表面がプラズマ重合膜でコートされている基材に保持された電気泳動媒体に分析すべき物質を加える工程、および

b) 電気泳動媒体に電圧を印加する工程

#### 【0018】

本発明において、基材とは、電気泳動媒体を保持することができるあらゆる形状を有する支持体を言う。具体的には、管状、溝状、あるいは板状の形状を有する支持体を示すことができる。板状の基材であっても、液体やゲル状の電気泳動媒体を保持することはできる。たとえば、2つの板に挟まれた微細な間隔には、毛管現象によって液体を保持することができる。これらの支持体の平面的な形状も制限されない。すなわち、直線状、円状、環状、多角形状、あるいは曲線状などの形状とすることができる。

#### 【0019】

支持体を構成する素材は任意である。本発明においては、電気泳動媒体と接触する表面がプラズマ重合膜によって改質される。そのため、支持体そのものの素材は電気泳動の結果には直接的な影響を与えない。したがって、たとえば次に示すような最低限の条件を満たす任意の素材を選択することができる。

- 電気泳動に伴う発熱に耐えなければならないこと、
- 一定の物理的な強度を有すること
- 絶縁体であること

### 【0020】

また基材には、一般に透明な素材が利用される。透明な素材を利用することによって、外部からの光学的な観測が可能となる。具体的には、たとえば、ガラスやプラスチックなど素材からなる支持体を基材として利用することができる。

### 【0021】

たとえばガラス平面を基材として用いるとき、電気泳動媒体を保持するために、その表面に溝を設けることができる。電気泳動媒体を保持する溝の幅は、1-100  $\mu\text{m}$  といった微細な空間とすることもできる。溝の断面は、三角形や四角形のような多角形、あるいはU字型や半円状とすることができる。このような微細な構造の溝をガラス等の支持体に設けるには、次のような方法を利用することができる。

- ・半導体加工技術のウェットエッチング法（フッ酸を使う方法）
- ・半導体加工技術のドライエッチング法（イオンスパッタリング、リアクティブイオンエッチング（ICPエッチングなど））
- ・レーザーせん孔
- ・ダイシングソー

### 【0022】

ウェットエッチング、ドライエッチング、あるいはレーザーせん孔の方法を利用すれば、自由な形状を有する微細な構造を容易に設けることができる。たとえば、10-100  $\mu\text{m}$  の幅、ならびに深さを有する溝を、ガラス表面に設ける技術が公知である。たとえば本発明者らは、reactive ion etching（リアクティブイオンエッチング）を利用した微小流路の作製に成功している。基材の素材に応じた異なる種類のエッチングガスを利用して、選択性の良い、またエッチレートの高いエッチングが可能となっている。

### 【0023】

基材表面に形成された溝は、開放系であっても良いし、閉鎖系とすることもで

きる。溝を形成した基材に、他の平板状の基材を重ねることによって、溝を閉鎖系とすることができる。溝を形成する基材と、この基材に重ねられる第2の基材は、同じ材質でも良いし異なる材質とすることもできる。更に、第2の基材の溝に重なる位置に穴を設けることによって、溝に試料や電気泳動媒体を供給するための連絡流路とすることもできる。あるいは、第2の基材に設けられた穴は、試料や緩衝液を保持するリザーバーとして利用することもできる。

#### 【0024】

また本発明には、ガラスキャピラリーを基材として用いることもできる。ガラスキャピラリー内にゲルや緩衝液を保持したキャピラリーカラムは、DNAや蛋白質の電気泳動用媒体の保持手段として一般的に用いられている。

#### 【0025】

本発明は、プラズマ重合膜によってコートされた表面を有する基材を利用する。本発明においては、基材表面の少なくとも電気泳動媒体が接触する表面が、プラズマ重合膜によってコートされる。微細な溝や、キャピラリー内部の狭い表面に対しても、プラズマ重合膜を形成することは可能である。プラズマ重合膜でコートされた基材は、公知の方法によって得ることができる。

#### 【0026】

プラズマ重合は、真空中でモノマー物質をプラズマ励起によって直接支持体表面に成膜を行う技術である。モノマー物質の成分を換えることによって、さまざまな特徴を持つプラズマ重合膜を得ることができる。プラズマ重合では原理的にはどのようなモノマーを用いても、重合が可能である。通常のポリマーを得るためには二重結合の開裂が必要となるのに対して、プラズマ中ではモノマー物質がばらばらになり多くの活性種を介した重合反応が起きるためである。

#### 【0027】

本発明におけるプラズマ重合膜のためのモノマー物質は、支持体表面に電気泳動分離に応じた好適な性状を与える重合膜を形成できるものであればよい。電気泳動分離に応じた好適な性状としては、たとえば以下に示すような性状を示すことができる。これらの性状のうち、いずれかの任意の性状を与えることができるモノマー物質は、本発明に利用することができる。

ー被泳動物質の基材への吸着の抑制

ー被泳動物質に対する親和性

たとえば、キャピラリー電気泳動に利用されるガラスキャピラリーは、表面に蛋白質を吸着しやすい。蛋白質の基材への吸着は、分離結果に影響を与える。蛋白質の基材への吸着は、蛋白質に対して不活性な表面を与えるプラズマ重合膜によって防ぐことができる。より具体的には、たとえば親水性表面を与えるプラズマ重合膜は、蛋白質の吸着の防止に有効である。このようなプラズマ重合膜を与えるモノマー物質としては、ヘキサジエン、ヘキサメチルジシロキサン（以下、HMDSと省略することもある）、およびアセトニトリルを示すことができる。

#### 【0028】

このような条件を満足するプラズマ重合膜を与えるモノマー物質としては、以下のようなものを示すことができる（「プラズマ重合」長田義人・編、角田光雄、中島薫、宮村雅隆、森田慎三、他著、東京化学同人1986年発行）。

#### 【0029】

アルカン、またはシクロアルカンとして、次の化合物を示すことができる。

メタン、エタン、プロパン、ブタン、イソブタン、ペンタン、イソペンタン、ネオペンタン、ヘキサン、イソヘキサン、3-メチルペンタン、2,2-ジメチルブタン、2,3-ジメチルブタン、ヘプタン、2,2,3-トリメチルブタン、オクタン、ノナン、デカン、メタン-d<sub>1</sub>、メタン-d<sub>2</sub>、メタン-d<sub>3</sub>、メタン-d<sub>4</sub>、シクロプロパン、シクロブタン、シクロペンタン、シクロヘキサン、メチルシクロヘキサン、シクロオクタン、cis-デカリン、およびtrans-デカリン。

#### 【0030】

アルケン、アルキン、あるいはシクロアルケンとしては、次の化合物を示すことができる。

エチレン、プロピレン、1-ブテン、(Z)-2-ブテン、(E)-2-ブテン、2-メチルプロペン、1-ペンテン、2-メチル-1-ブテン、3-メチル-1-ブテン、2-メチル-2-ブテン、1-ヘキセン、(E)-2-ヘキセン、(E)-3-ヘキセン、3-メチル-1-ペンテン、2,3-ジメチル-2-ブテン、1-ヘプテン、1-オクテン、(E)-2-オクテン、1-デセン、1,3-ブタジエン、(Z)

−1,3−ペンタジエン、(E) −1,3−ペンタジエン、イソプレン、2,3−ジメチル−1,3−ブタジエン、アセチレン、プロピン、1−ブチン、2−ブチン、1−ペンチン、3−メチル−1−ブチン、ビニルアセチレン、シクロプロペン、シクロブテン、シクロペンテン、シクロヘキセン、シクロヘプテン、シクロペンタジエン、1,3−シクロヘプタジエン、およびシクロオクタテトラエン。

### 【0031】

アルコール、アルデヒド、ケトン、カルボン酸、あるいはエステルとしては次の化合物を示すことができる。

メタノール、エタノール、1−プロパノール、2−プロパノール、1−ブタノール、2−ブタノール、2−メチル−1−プロパノール、2−メチル−2−プロパノール、アリルアルコール、1,3−ブタンジオール、2,3−ブタンジオール、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、プロピオンアルデヒド、ブチルアルデヒド、バレルアルデヒド、イソバレルアルデヒド、アクリルアルデヒド、クロトンアルデヒド、グリオキサール、アセトン、2−ブタノン、2−ペンタノン、3−メチル−2−ブタノン、3−ペンタノン、2−ヘキサノン、4−メチル−2−ペンタノン、2−ヘプタノン、シクロブタノン、シクロペンタノン、シクロヘキサノン、シクロヘプタノン、シクロオクタノン、4−メチル−3−ペンテン−2−オン、2,3−ブタンジオン、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸、イソ酪酸、アクリル酸、ギ酸メチル、ギ酸エチル、ギ酸プロピル、ギ酸ブチル、ギ酸イソブチル、酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸プロピル、酢酸イソプロピル、酢酸ブチル、酢酸イソブチル、酢酸s−ブチル、プロピオン酸メチル、酪酸メチル、酢酸ビニル、および酢酸アリル。

### 【0032】

エーテル、アミン、あるいはその他のモノマー物質として利用可能な化合物を以下に示す。

ジメチルエーテル、ジエチルエーテル、ジプロピルエーテル、ジイソプロピルエーテル、ジブチルエーテル、エチレンオキシド、1,3−ジオキソラン、1,3−ジオキサン、1,4−ジオキサン、メチルビニルエーテル、メチルアミン、エチルアミン、プロピルアミン、イソプロピルアミン、ブチルアミン、イソブチルアミン、s−ブチルアミン、t−ブチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、

ジエチルアミン、トリエチルアミン、ジプロピルアミン、ジイソプロピルアミン、トリプロピルアミン、ジブチルアミン、アリルアミン、ホルムアミド、アセトアミド、N-メチルアセトアミド、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、メタンチオール、エタンチオール、硫化ジメチル、硫化ジエチル、硫化ジプロピル、二硫化ジメチル、二硫化ジエチル、メタンジチオール、1,2-エタンジチオール、ニトロメタン、ニトロエタン、1-ニトロプロパン、2-ニトロプロパン、1-ニトロブタン、2-ニトロブタン、アセトニトリル、プロピオニトリル、およびアクリロニトリル。

### 【0033】

また、次のようなハロゲン化物をモノマー物質に利用することができる。

フルオロメタン、ジフルオロメタン、フルオロホルム、テトラフルオロメタン（四フッ化炭素）、フッ化ビニル、1,1-ジフルオロエチレン、(Z)-1,2-ジフルオロエチレン、(E)-1,2-ジフルオロエチレン、トリフルオロエチレン、テトラフルオロエチレン、1,1,4,4-テトラフルオロブタジエン、ペルフルオロブタジエン、2-フルオロエタノール、トリフルオロ酢酸、1,1,1-トリフルオロ-2-プロパノン、ペルフルオロアセトン、クロロメタン、ジクロロメタン、クロロホルム、テトラクロロメタン（四塩化炭素）、クロロエタン、1,1-ジクロロエタン、1,2-ジクロロエタン、1-クロロプロパン、2-クロロプロパン、1,2-ジクロロプロパン、1,3-ジクロロプロパン、1-クロロブタン、2-クロロブタン、1-クロロ-2-メチルプロパン、2-クロロ-2-メチルプロパン、クロロシクロプロパン、1,1-ジクロロシクロプロパン、塩化ビニル、1,1-ジクロロエチレン、(Z)-1,2-ジクロロエチレン、(E)-1,2-ジクロロエチレン、トリクロロエチレン、テトラクロロエチレン、3-クロロプロペン、1,3-ジクロロプロペン、クロロアセチレン、ジクロロアセチレン、1-クロロプロピン、2-クロロエタノール、クロロアセトアルデヒド、クロロアセトニトリル、ジクロロアセトニトリル、トリクロロアセトニトリル、ブロモメタン、ジブロモメタン、ブロモホルム、テトラブロモメタン（四臭化炭素）、ブロモエタン、1,1-ジブロモエタン、1,2-ジブロモエタン、1-ブロモプロパン、2-ブロモプロパン、1,3-ジブロモプロパン、1-ブロモブタン、2-ブロモブタン、1-ブロモ-2-メ

チルプロパン、2-ブromo-2-メチルプロパン、1,4-ジブromobutan、1-ブromobisシクロ [2.2.1] ヘプタン、1-ブromobisシクロ [2.2.2] オクタン、臭化ビニル、3-ブromopropan、1,3-ジブromopropan、ブromoアセチレン、ジブromoアセチレン、1-ブromopropan、2-ブromoエタノール、ヨードメタン、ジヨードメタン、ヨードホルム、テトラヨードメタン（四ヨウ化炭素）、ヨードエタン、1-ヨードプロパン、2-ヨードプロパン、1-ヨードブタン、2-ヨードブタン、1-ヨード-2-メチルプロパン、2-ヨード-2-メチルプロパン、1-ヨードペンタン、3-ヨードプロパン、ヨードアセチレン、ジヨードアセチレン、2-ヨードエタノール、1-ブromo-2-クロロエタン、1,1,1-トリフルオロ-2-ヨードエタン、2-クロロ-1,1-ジフルオロエチレン、1-クロロ-1,2,2-トリフルオロエチレン、1,1-ジクロロ-2,2-ジフルオロエチレン、1-ブromo-2-クロロアセチレン、1-クロロ-2-ヨードアセチレン、および1-ブromo-2-ヨードアセチレン。

#### 【0034】

更に、以下のような芳香族炭化水素がモノマー物質として利用できる。

ベンゼン、トルエン、エチルベンゼン、プロピルベンゼン、クメン、ブチルベンゼン、s-ブチルベンゼン、t-ブチルベンゼン、o-キシレン、m-キシレン、p-キシレン、o-ジエチルベンゼン、m-ジエチルベンゼン、p-ジエチルベンゼン、メシチレン、1,2,4,5-テトラメチルベンゼン、スチレン、フェニルアセチレン、(E)-1-プロペニルベンゼン、(E)-1-フェニルブタジエン、2-フェニルブタジエン、ビフェニル、ナフタレン、1-メチルナフタレン、2-メチルナフタレン、アントラセン、フェナントレン、ピレン、ナフタセン、クリセン、およびペンタセン。

#### 【0035】

加えて、次のベンゼン誘導体等も本発明のモノマー物質に有用である。

フェノール、ベンズアンデヒド、アセトフェノン、アニソール、ベンジルメチルエーテル、アニリン、ベンジルアミン、チオフェノール、ベンゾニトリル、フルオロベンゼン、クロロベンゼン、ブromobenzen、ヨードベンゼン、o-ジクロロベンゼン、m-ジクロロベンゼン、p-ジクロロベンゼン、o-ジブromobenzen

ゼン、m-ジブロモベンゼン、p-ジブロモベンゼン、トリフルオロベンゼン、ヘキサフルオロベンゼン、o-フルオロトルエン、m-フルオロトルエン、p-フルオロトルエン、o-クロロトルエン、p-クロロトルエン、o-ブロモトルエン、p-ブロモトルエン、o-ヨードトルエン、m-ヨードトルエン、p-ヨードトルエン、p-クロロフルオロベンゼン、およびo-クロロヨードベンゼン。

#### 【0036】

また、次のような複素環式化合物がモノマー物質として利用できる。

ピリジン、2-メチルピリジン、3-メチルピリジン、4-メチルピリジン、2,6-ジメチルピリジン、2,5-ジメチルピリジン、2,4-ジメチルピリジン、ピリダジン、ピリミジン、ピラジン、1,3,5-トリアジン、ピリジンN-オキシド、2-メチルピリジンN-オキシド、3-メチルピリジンN-オキシド、4-メチルピリジンN-オキシド、2,6-ジメチルピリジンN-オキシド、フラン、メチルフラン、テトラヒドロフラン、ピロール、ピロリジン、チオフェン、および2-クロロチオフェン。

その他、トロポンやトロポロンのようなトロポノイド化合物、またテトラメチルシラン、テトラメチルスズ、テトラメチル鉛に代表される有機金属化合物をモノマー物質に用いることもできる。

#### 【0037】

これらのモノマー物質によってプラズマ重合膜を成膜する条件は公知である。具体的には、プラズマ重合反応の再現性に影響を与える主な要因として、たとえば流速、放電電力、放電時間、そして圧力といった条件が重要であるとされている。プラズマ重合においては、装置やモノマーに合わせて最適な重合条件を設定する必要がある。W/FM（ここでWは放電電力、Fは流速、Mはモノマーの分子量）が同じであれば、膜質はほぼ同じであるとする報告(Yasuda, Plasma Polymerization, Academic Press, New York, 1985)がある。

#### 【0038】

利用するモノマー物質や、最終的に必要なプラズマ重合膜の膜厚等を考慮して、これらの条件を適切に調整することは当業者が日常的に行っていることである。また文献的にも各種のパラメーターがプラズマ重合膜の性質に及ぼす影響は明



らかにされている (Surface and Coatings Technology 82:1-15, 1996, Polymer Engineering and Science 37/7:1188-1194, 1997)。後にポリヌクレオチドの固定化を目的とする場合に有利なモノマー物質として説明するヘキサメチルジシロキサンでプラズマ重合膜を作成するには、たとえば次のような範囲のもとで最適な条件を選択することにより、およそ  $0 \sim 240 \text{ \AA}$  のプラズマ重合膜を形成することができる。

流速:  $0 \sim 50 \text{ cm}^3/\text{min}$ .

放電電力:  $0 \sim 300 \text{ W}$

圧力:  $10^{-6} \sim 10 \text{ Torr}$

放電時間  $0 \sim 5 \text{ 分}$

(温度:  $0 \sim 100^\circ \text{C}$ )

#### 【0039】

あるいは、 $0 \sim 240 \text{ \AA}$  のプラズマ重合膜を形成するための、より望ましい条件として、次の条件を示すことができる。

流速:  $10 \sim 50 \text{ cm}^3/\text{min}$ .

放電電力:  $20 \sim 100 \text{ W}$

圧力:  $0.05 \sim 0.6 \text{ Torr}$

放電時間  $30 \text{ 秒} \sim 5 \text{ 分}$

(温度: 室温)

#### 【0040】

本発明の電気泳動分離方法の泳動原理は限定されない。電気泳動分離は、泳動媒体の条件によって、様々な性状に基づく分離を可能とする。電気泳動分離の分離条件として、pH勾配、分子篩（ふるい）、泳動媒体中で接触する官能基との相互作用等を示すことができる。pH勾配を備えた泳動媒体中における電気泳動を蛋白質に利用すれば、等電点電気泳動となる。またポリアクリルアミドゲルのような分子篩効果を持つ媒体中で電気泳動を行うとき、SDS、尿素、あるいはグアニジンのような蛋白質変性剤を共存させれば、変性条件下での分子篩電気泳動が成立する。あるいは、変性剤を用いなければ、ネイティブな条件下での電気泳動となる。

## 【0041】

同様に分子篩（ふるい）に基づいて核酸を泳動するとき、核酸は長さに基づいて分離される。PCR-SSCPのように非変性条件と変性条件下で同じ核酸を電気泳動分離して、両者の結果を比較して立体構造の違いを明らかにする分析方法も公知である。

更に、さまざまな官能基を備えた泳動媒体の利用も可能である。具体的には、静電的相互作用、水素結合、疎水結合、あるいは任意の組み合わせの親和性物質などを示すことができる。親和性物質としては、抗原-抗体、相補的な塩基配列からなる核酸のハイブリダイゼーション、アビジン-ビオチンや、糖-レクチンのような親和性物質の組み合わせ等がある。

## 【0042】

本発明に好適な電気泳動の原理の一つに、等電点電気泳動を示すことができる。本発明に基づいてキャピラリー等電点電気泳動(CIEF)を行うためには、内面処理（コーティング）を施して電気浸透流を生じないキャピラリーを作製する。本発明において、CIEFに有用な好ましいモノマー物質には、例えばヘキサジエン、ヘキサメチルジシロキサン、およびアセトニトリルを示すことができる。

陽極液と、陰極液を両端に導入し、両端に電圧を印加する。陽極液には、電解質の中で最も酸性の強いものよりも低いpHを与える酸性の溶液が用いられる。一方、陰極液には、最も塩基性の強いものよりも高いpHを与えるアルカリ性の溶液を利用する。それぞれの両性電解質は等電点の位置まで移動した後停止する。蛋白質成分は、キャピラリー内に形成されたpH勾配上の等電点の位置で濃縮され、細いゾーンとして観測される（図6）。

## 【0043】

キャピラリーゾーン電気泳動(CZE)では、1種類の電解質溶液をキャピラリー内に導入することにより、キャピラリー内壁および内壁に接する電解質溶液の間に電気二重層が形成される。電圧がかけられると電解質溶液が溶媒を伴って移動し、電気浸透流が生じる。電気浸透流は分離された成分イオンを移動させる駆動力となる。試料成分はそれぞれの電荷とサイズに応じた静電気力を受けて対極へ引き寄せられ、電荷とサイズの違いが移動度の違いとなり成分が分離される（図

7)。

CIEFはCZEとは異なり、電気泳動現象は発生させるが、電気浸透流の発生は極力抑制するべきである。CIEFにおいてはキャピラリーの内面修飾法、キャピラリー内径等のサイズ、ランニングバッファ溶液としての両性電解質の組成が電気浸透現象の効果に大きく影響を与え、結果としてCIEFの分離能に大きな影響を与える。

#### 【0044】

本発明はまた、電気泳動用媒体が接触する表面をプラズマ重合膜でコートした電気泳動分析用基材に関する。既に述べたように、電気泳動媒体が接触する表面をプラズマ重合膜でコートした基材は、本発明による電気泳動方法に用いることができる。

#### 【0045】

更に本発明は、次の要素で構成される電気泳動分析装置に関する。

a) 電気泳動用媒体が接触する表面をプラズマ重合膜でコートした電気泳動媒体を保持するための基材、および

b) a)の基材に保持された電気泳動用媒体に電圧を印加するための電極

#### 【0046】

加えて本発明は、基材表面にプラズマ重合膜を形成する工程を含む、電気泳動分析用基材の製造方法に関する。基材をプラズマ重合膜でコートする方法は先に述べたとおりである。基材の電気泳動用媒体が接触する表面をプラズマ重合膜でコートすることによって、先に述べた電気泳動分離方法に好適な基材とすることができる。

#### 【0047】

更に本発明は、基材表面にプラズマ重合膜を形成する工程を含む、電気泳動分析用基材の表面を改質する方法に関する。プラズマ重合膜は、表面の改質方法として優れた特徴を有する。すなわち、プラズマ重合膜は、どんな複雑な表面構造に対しても、容易に均質な膜を形成することができる。また、モノマー物質の選択によって、基材表面に任意の性状を与えることができる。したがって、たとえば、基材表面が電気泳動分離に干渉する可能性がある場合には、その表面をプラ

ズマ重合膜でコートすることによって、干渉を防ぐことができる。あるいは本発明に基づいて、基材表面に、電気泳動分離に必要な性状を積極的に付与することもできる。

#### 【0048】

プラズマ重合によって、種々の官能基を基材表面に付与することができる。導入された官能基を利用して、蛋白質と多様な相互作用をさせながら電気泳動による分離が可能となる。例えば、アセトニトリルのような窒素原子を持つ有機物質をモノマー物質とすると、表面にアミノ基を持つプラズマ重合膜が合成できることが公知である。このようなプラズマ重合膜コート表面を利用して、静電的な相互作用（膜のプラス電荷と蛋白質のマイナス電荷）を行わせながら蛋白質の電気泳動を行うことが可能である。

また酢酸などカルボン酸やエステルなどの有機物質をモノマー物質とすると、表面にカルボキシル基を持つプラズマ重合膜が合成される。その結果、アミノ基と同様の静電的な相互作用であり、かつ膜のマイナス電荷と蛋白質のプラス電荷の間での相互作用による電気泳動分離が可能になる。

さらにアルカンやシクロアルカン、芳香族炭化水素などをモノマー物質とすると、表面が極めて疎水的なプラズマ重合膜が合成されるので、疎水的相互作用に基づく分離が可能である。すなわち上記3つの例では、それぞれ陰イオン交換クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィーと類似の作用を有する表面を実現できる。

#### 【0049】

本特許出願は、国等の委託研究の成果に係る特許出願（平成11年度新エネルギー・産業技術総合開発機構「蛋白質発現・相互作用解析技術開発」委託研究、産業活力再生特別措置法第30条の適用を受けるもの）である。

#### 【0050】

##### 【実施例】

##### 1. 装置および材料

##### 〔プラズマ重合装置〕

実施例において、プラズマ重合膜の重合方式として、RF電源、外部電極方式に

よるAfter glow方式を利用した。サムコ社製のプラズマ基礎研究装置BP-1をベースに種々のユニットを追加して、流量、圧力、およびパワーマッチングを自動で制御可能な装置を作製した。装置の構成を以下に示す。

反応器(チャンバー)：パイレックス(登録商標)製210mm  $\phi$ 、

試料ステージ：チャンバー下部に、SUS304製、ヒーター加熱制御ステージ設置

排気系：ファイファー社製ターボ分子ポンプ+エドワーズ社製ロータリーポンプ

RF電源：サムコ社製13.56MHz、300W、水晶発振

マッチング：サムコ社製オートマッチング方式

圧力コントロール：MKS社製バトロロン真空計からの圧力をVAT社製オートマチックプレッシャーコントロール(APC)バルブユニットで自動制御

ガス導入系：試料モノマー、アルゴン、酸素ラインをSTEC社製電磁弁とマスフローコントロール(MFC)ユニットで自動制御

#### 【0051】

##### [ダイシングソー]

キャピラリー構造作製のため、DISCO社製オートマチックダイシングソー、DAD 321を利用した。このダイシングソーにはX、Yステージが搭載され、基板となるガラスの位置を手作業で変更することなく、直行するキャピラリーを作製可能である。また、深さ方向(Z方向)のブレードの降下位置と速度が任意にコントロール可能であり、任意の深さのキャピラリー構造物が作製可能である。XYZ方向の加工精度はマイクロメートルオーダーである。上記の一連の操作はすべてプログラミング(レシピ)による内蔵コンピュータ制御で行った。

#### 【0052】

##### [表面段差測定装置]

ガラス基板上に作製したキャピラリーの大きさを測定するため、Veeco社製表面段差測定装置、DEKTAK3STを利用した。この装置は測定距離とスピードがコンピュータで制御され、得られた結果はデジタル化される。得られたデータは、断面曲線、あらさ曲線、うねり曲線等としてモニタ画面上に表示することができる。必要に応じて内蔵ソフトウェアにより深さ、高さ、傾斜等様々な解析を行った。

。最後に得られたデータはプリンター上に印字し、同時にディスクにも記録した。

### 【0053】

#### [キャピラリー電気泳動測定システム]

作製したキャピラリー電気泳動チップによる電気泳動実験を行うためのシステムは、電場を印加するための電源として、BIOCRAFT社製高電圧電源BP-3、またはグラスマン ジャパン ハイボルテージ株式会社（横浜市）の電源PS/FC40R03CTZ10を利用した。BP-3を利用してキャピラリー電気泳動チップに0から1000Vまでの電源を印加することが可能である。PS/FC40R03CTZ10は、2000Vまでの電源を供給する。また必要に応じてSANSYO社製クールプレート、SA-800を利用した。このプレートはペルチェ素子により上部アルミナヒートブロックを4℃まで冷却する。このプレートによって、電場印加中にキャピラリー電気泳動チップから発生する熱を冷却することができる。

### 【0054】

#### [実験材料]

基板は、テンパックスガラスを利用した。また、シリコンウエハーは信越シリコン社製シリコンウエハー（P型、100面、直径100mm、厚さ525mm、抵抗率10~20 $\Omega \cdot \text{cm}$ ）を使用した。またガラス同士の接合にはアーデル社製、UV光硬化性接着剤、ベネフィックスPCを使用した。その他の試薬はEL級、もしくは特級品以上を使用した。

### 【0055】

#### 2. 実験方法

##### [キャピラリー電気泳動チップの作製]

実験に用いたデバイスは、図1に示すように下部のガラス基板と上部のガラスカバーが重ね合わされた構造をしている。下部ガラス基板上にはダイシングソーにより溝が掘られている。また上部ガラスカバーは貫通穴を有している。2枚のガラスを重ね合わせると、キャピラリー両端には、貫通穴からなる溶液貯め（リザーバ）が形成される。また、上部ガラスカバーおよび下部のガラス基板表面には種々の性質を持つ薄膜が形成されている。ガラス基板とガラスカバーは光硬化

性樹脂により重ね合わされ、キャピラリーを形成した。

#### 【0056】

ガラス基板およびガラスカバーの大きさは、それぞれ長さ80mm、幅10mm、厚み1.1mmであり、キャピラリーは、長さ70mm、幅0.9mm、深さ100 $\mu$ mである。上部ガラスカバーに作製された貫通穴は、直径4mm、貫通深さ1.1mmである。

以下にデバイス作製手順を示す。

#### 【0057】

洗浄したガラス板を用意し、300 $\mu$ m厚のダイシングソーブレード (DQAG06 34、ハードレジン、ダイヤモンドブレード) をダイシングソーのスピンデルに装着した。2.0mm/min. の低速条件下でダイシングした。それぞれのガラス板表面を後述するプラズマ重合法や化学修飾法で処理した。最後に、キャピラリー構造を形成するため貫通穴が作製されたガラスカバーと溝が形成されたパイレックス (登録商標) 製のガラス基板とを張り合わせ、隙間に光硬化性樹脂を流し込み、完全に硬化するまでUV照射した。

#### 【0058】

[キャピラリー内部の化学修飾処理]

シランカップリング溶液 (80 $\mu$ L[3-(methacryloyloxy)propyl]trimethoxysilane+20mLH<sub>2</sub>O) に、酢酸を加えpH3.5に調整した。続けてデバイスに接続されたチューブを介してカップリング溶液をキャピラリー内に導入し、室温で1時間反応した。反応完了後、蒸留水を流しキャピラリー内を洗浄した。

#### 【0059】

次に脱気したアクリルアミド3%(w/v)溶液 (1 $\mu$ L TEMED+1mg/mL potassium persulphateを含む3-(trimethylsilyl)propyl methacrylate溶液) を調製した。続けてデバイスに接続されたチューブを介してアクリルアミド溶液をキャピラリー内に導入し、室温で30分反応した。反応完了後、未反応のアクリルアミドを排出し、蒸留水で洗浄した。最後に35℃で乾燥し、キャピラリー内部表面修飾を完了させた。

#### 【0060】

# [プラズマ重合膜作製]

本実施例では内壁修飾化のため、電荷および疎水性を変化させた膜を幾つか作製した。作製した膜は、ヘキサジエン、ヘキサメチルジシロキサン、アセトニトリルをモノマー物質とし、それぞれ異なる性質を持つ膜を作製した。また、膜厚はすべて100nmとした。

基板をチャンバー内に入れ、真空度を $3 \times 10^{-5}$  Torrにした。モノマー物質をチャンバー内に満たし、所定の圧力、流量に調整した。一定時間放電を行い、プラズマ重合膜を成膜、その後基板を取り出した。各モノマー物質のプラズマ重合膜の成膜条件と、膜質、膜厚を表1に示した。

【0061】

【表1】

条件	モノマー物質		
	1,5-ヘキサジエン (HDE)	ヘキサメチルジシロキサン (HMDS)	アセトニトリル (MeCN)
放電電力 (W)	150	150	150
圧力 (mTorr)	100	100	100
屈折率	1.49	1.38	1.58
膜質	疎水性	疎水性	親水性
膜厚 (nm)	100	100	100

【0062】

## 3. 結果及び考察

[作製したキャピラリー電気泳動チップを利用した蛋白質の分離]

上記で示したキャピラリー電気泳動チップおよび内壁修飾法を利用して蛋白質を分離した。分離法は等電点電気泳動法 (CIEF) を利用した。またサンプルには、ファルマシア製のIEFマーカー蛋白質を利用した。このサンプルには3種類の肉眼で判別できる (visible) 蛋白質が含まれているため、電気泳動後のバンドを肉眼で確認することができる。各蛋白質の等電点と色を以下に示す。

フィコシアニン (pI = 4.45) 青いバンド  
 ヘモグロビン (pI = 7.0) 赤茶色のバンド  
 シトクロム c (pI = 9.6) 赤いバンド

【0063】



実験手順は、次のとおりである。まずサンプルをキャピラリー全体に満たした。サンプル中の蛋白質濃度は、表2に示すとおり、 $20\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $33\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、および $62\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$ の3とおりとした。次に陰極液として $25\text{ }\mu\text{L}$ の $0.1\text{ M NaOH}$ を陰極側リザーバへ、また陽極液として $25\text{ }\mu\text{L}$ の $0.2\text{ M H}_3\text{PO}_4$ を陽極側リザーバに注入した。キャピラリーの両端に電圧を印加して、等電点電気泳動を行った。電気泳動による蛋白質の濃縮 (focusing) の様子を図2～図4に示す。

更に、未修飾、従来法であるアクリルアミド修飾法、そしてプラズマ重合法を用いた本発明によるキャピラリー電気泳動チップで電気泳動による泳動完了時間を比較した。印加電圧は、 $1000\text{ V}$ 、または $2000\text{ V}$ とした。

#### 【0064】

図5に示すように印加電圧が $1000\text{ V}$ 、 $2000\text{ V}$ のいずれの場合にも、5種類のキャピラリーの中でアセトニトリル修飾キャピラリーで最も速く電気泳動が終了した。たとえば図2に示すように、アセトニトリル修飾キャピラリーにおいては、11分でほぼ泳動を完了できている。 $2000\text{ V}$ 以上の印加電圧を加えた場合には、蛋白質のアグリゲーション (凝集) が見られることもあった。したがって本実施例においては、アセトニトリル修飾キャピラリーを使って印加電圧 $1000\text{ V}$ という条件が最適と考えられた。

#### 【0065】

更に、表2に各キャピラリーによるサンプルの泳動結果を示した。表2は、各キャピラリーにおける印加電圧 $1000\text{ V}$ の場合の、各蛋白質の泳動位置 (Band position)、およびバンド幅 (Band width) を示す (単位はいずれも $\text{mm}$ )。泳動位置は電極の位置を0として電極からバンドの中心までの距離を計測した結果である。

この実験の条件では、アセトニトリル修飾キャピラリーの泳動結果が泳動誤差が小さく、かつ再現性にも優れていた。したがって、アセトニトリル修飾キャピラリーは、本発明による蛋白質の等電点電気泳動用基材として好ましい素材である。

#### 【0066】

【表 2】

Concentration		Cytochrome <i>c</i>	Hemoglobin	Phycocyanin
Non-coated	20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Band position	3 $\pm$ 1	19 $\pm$ 0
		Band width	2 $\pm$ 0	40 $\pm$ 1
	33 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Band position	5 $\pm$ 0	4 $\pm$ 1
		Band width	17 $\pm$ 5	35 $\pm$ 3
	62 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Band position	6 $\pm$ 0	4 $\pm$ 1
		Band width	14 $\pm$ 1	45 $\pm$ 3
Acrylamide coated	20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Band position	30 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1
		Band width	2 $\pm$ 0	26 $\pm$ 6
	33 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Band position	N.D.	3 $\pm$ 1
		Band width	10 $\pm$ 4	44 $\pm$ 6
	62 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Band position	6 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0
		Band width	17 $\pm$ 3	33 $\pm$ 2
Acetonitrile coated	20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Band position	8 $\pm$ 1	8 $\pm$ 1
		Band width	3 $\pm$ 0	32 $\pm$ 1
	33 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Band position	N.D.	6 $\pm$ 0
		Band width	20 $\pm$ 1	37 $\pm$ 0
	62 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Band position	6 $\pm$ 0	5 $\pm$ 1
		Band width	27 $\pm$ 1	41 $\pm$ 2
Hexadiene coated	20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Band position	9 $\pm$ 0	7 $\pm$ 0
		Band width	18 $\pm$ 6	37 $\pm$ 5
	33 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Band position	6 $\pm$ 1	5 $\pm$ 1
		Band width	32 $\pm$ 2	49 $\pm$ 2
	62 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Band position	7 $\pm$ 0	5 $\pm$ 1
		Band width	23 $\pm$ 2	37 $\pm$ 1
HMDS coated	20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Band position	9 $\pm$ 0	11 $\pm$ 3
		Band width	31 $\pm$ 8	64 $\pm$ 2
	33 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Band position	5 $\pm$ 1	3 $\pm$ 0
		Band width	28 $\pm$ 6	61 $\pm$ 5
	62 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Band position	7 $\pm$ 0	4 $\pm$ 2
		Band width	35 $\pm$ 2	63 $\pm$ 2

The band position is calculating by setting the cathode as 0 and computing distance to cathode, the unit is mm. N=3.

【0067】

## 【発明の効果】

本発明により、電気泳動媒体が接触する基材表面の様々な性質を制御しうる電気泳動分離方法とデバイスが提供された。ガラスなどの電気泳動分離媒体を保持する基材は、時として電気泳動分離の結果に干渉する場合があった。本発明を用いれば、プラズマ重合膜のコートによってガラス表面が改質され、結果として良好な電気泳動分離用の基材とすることができた。プラズマ重合膜の形成は、微細な構造に対しても応用可能で、しかも大量の基材をまとめて処理することができる。つまり、均質な電気泳動用基材を、容易に大量生産できる産業上も有用な技術である。

【0068】

種々のデバイスの大量生産を可能とする技術として、フォトマスクのパターンを光で一括転写する技術がある(植岡清威、二瓶公志、フォトエッチングと微細加工、総合出版社、1989)。この技術は、フォトファブリケーションなどと呼ばれることもある。フォトファブリケーションを利用すれば、超LSIに代表される

ように数百万個からなる部品が組み立てられたデバイスを、数mm角のシリコン基板上に、一体構造として作製可能である。更にフォトファブ리케이션においては、複数のフォトマスクのパターンを組み合わせて利用することができる。この特徴を利用すれば、付着加工、表面改質加工といった異なる処理工程を組み合わせることが可能である。したがってフォトファブ리케이션を利用すれば、電気泳動分析用基材を作成することもできる。

#### 【0069】

フォトファブ리케이션に応用される表面改質や薄膜形成のための技術は、ドライプロセスであることが重要である。プラズマ重合法はドライプロセスなので、フォトファブ리케이션によるデバイス作成に好適である。更にプラズマ重合法を利用すれば、適切なモノマー物質を選択することにより表面に官能基を持つ薄膜を作製することができる。またプラズマ重合膜は、高度な橋かけ構造を持つピンホールフリーな膜であることから流路内部の修飾薄膜として最適である。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】 実施例に用いたキャピラリー電気泳動チップの構造を示す図。

【図2】 アセトニトリル修飾キャピラリーを用い、蛋白質濃度  $33 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  のサンプルを  $1000\text{V}$  で泳動したときの、スポットの経時的な移動を示す写真。各スポットは、陽極側（右側）からフィコシアニン、ヘモグロビン、およびシトクロム c に相当する。

【図3】 キャピラリー内壁が未修飾(a)またはアクリルアミドにより化学修飾されたチップ(b)を用いて電気泳動を行った場合の、蛋白質の濃縮の様子を示す写真。

【図4】 キャピラリー内壁がアセトニトリル(c)、ヘキサジエン(d)またはHMDS(e)によりコーティングされたキャピラリー電気泳動チップを用いて電気泳動を行った場合の、蛋白質の濃縮の様子を示す写真。

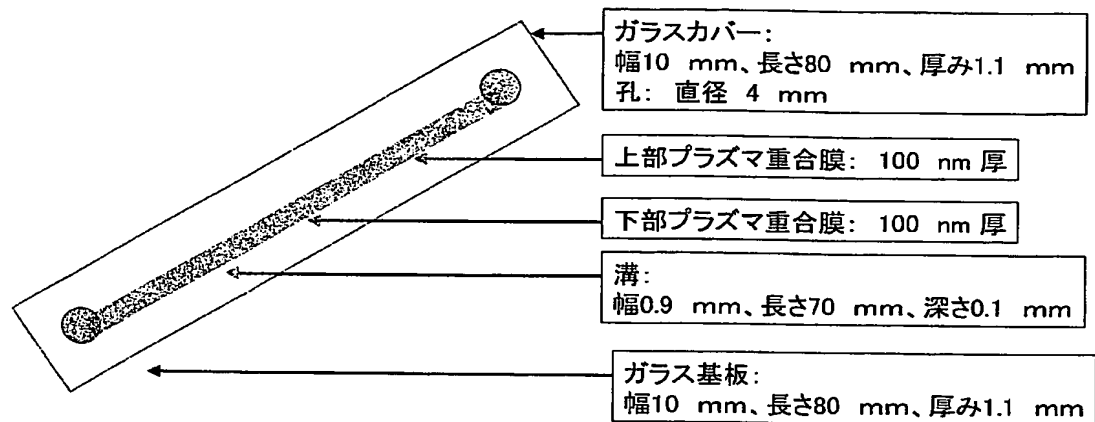
【図5】 印加電圧を  $1000\text{V}$ 、または  $2000\text{V}$  に設定した場合の電気泳動時間を示すグラフ。縦軸は泳動時間、横軸は修飾物質を示す。

【図6】 キャピラリー等電点電気泳動 (CIEF) の原理を示す図。

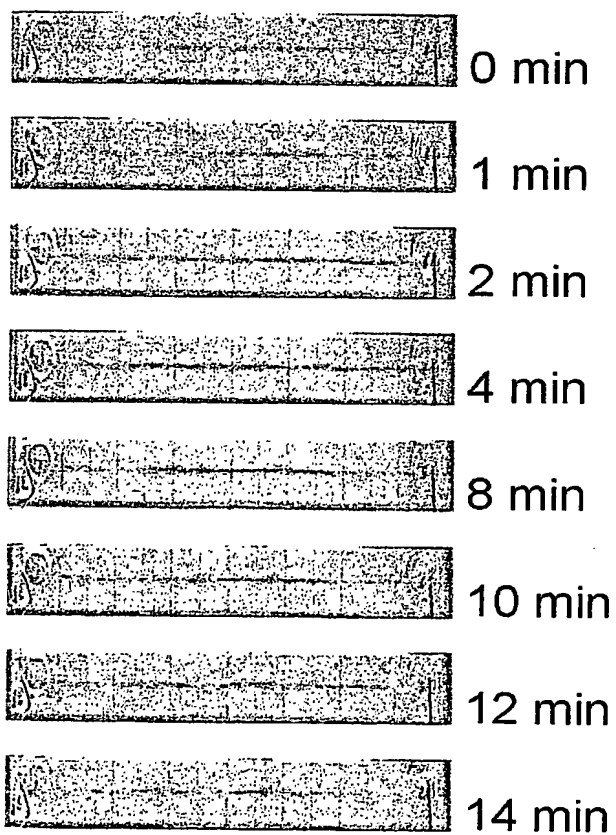
【図 7】 キャピラリーゾーン電気泳動 (CZE) の原理を示す図。

【書類名】 図面

【図 1】

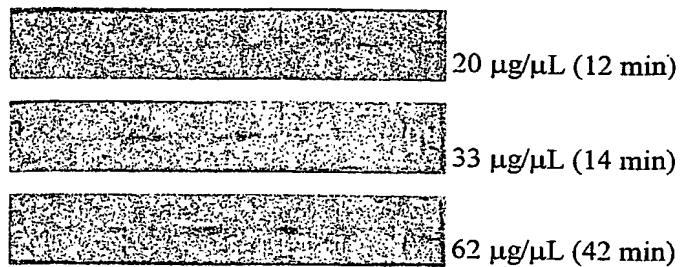


【図 2】

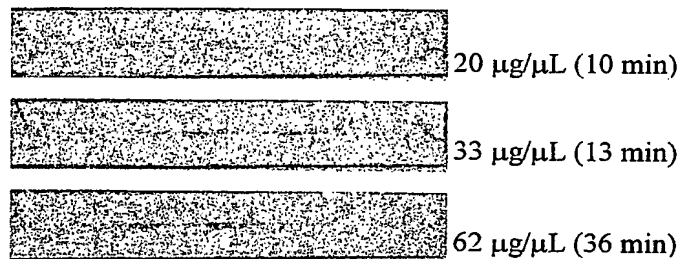


【図 3】

## (a) Non-coated glass capillary

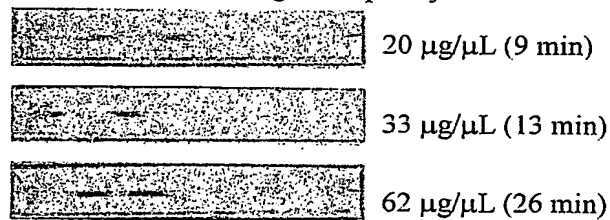


## (b) Acrylamide-coated glass capillary

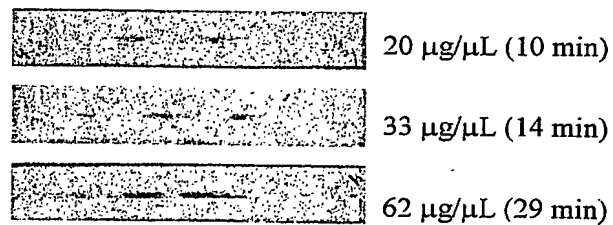


【図 4】

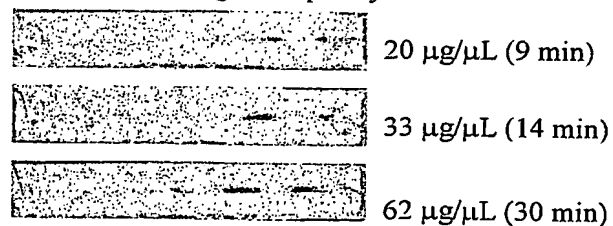
## (c) Acetonitrile-coated glass capillary



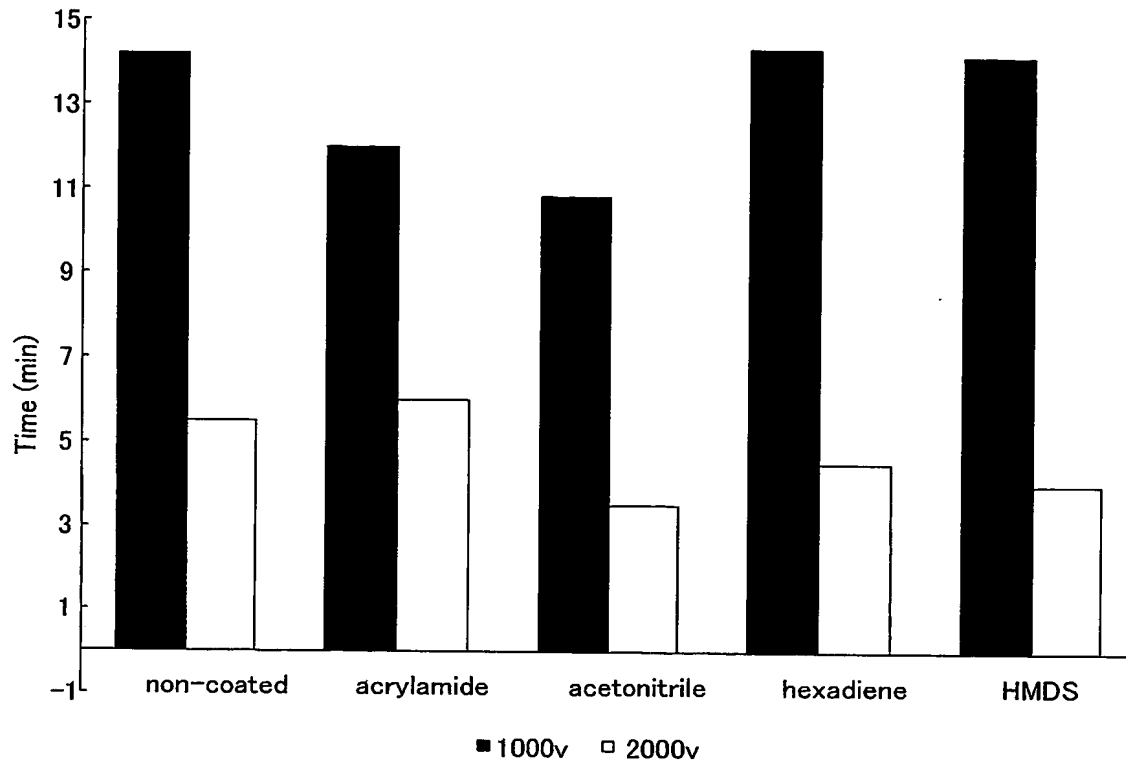
## (d) Hexadiene-coated glass capillary



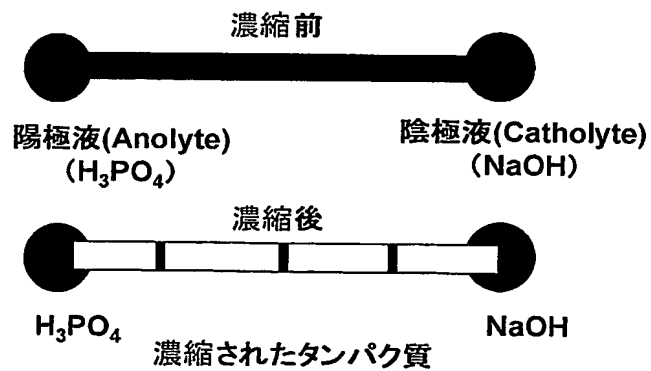
## (e) HMDS-coated glass capillary



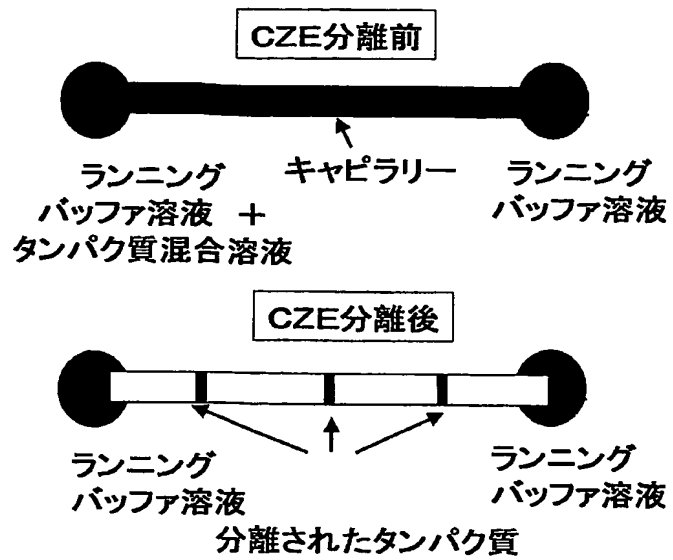
【図 5】



【図 6】



【図 7】





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 電気泳動媒体が接触する基材表面の様々な性質を制御しうる電気泳動分離方法とデバイスの提供を課題とする。

【解決手段】 次の工程を含む電気泳動分析が提供された。

a) 電気泳動媒体に接する表面がプラズマ重合膜でコートされている基材に保持された電気泳動媒体に分析すべき物質を加える工程、および

b) 電気泳動媒体に電圧を印加する工程

プラズマ重合膜の利用により、任意の形状に対して、その表面に質的にも厚さにおいても均一な膜を形成することができる。またモノマー物質の選択により、任意の性質を表面に与えることもできる。マイクロチップにおける蛋白質の吸着も効果的に抑制できる。

【選択図】 なし

## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-259889
受付番号	50201328300
書類名	特許願
担当官	伊藤 雅美 2132
作成日	平成 14 年 9 月 11 日

## &lt; 認定情報・付加情報 &gt;

## 【特許出願人】

【識別番号】	502324011
【住所又は居所】	東京都世田谷区北沢 1-12-6
【氏名又は名称】	矢野 和義

## 【特許出願人】

【識別番号】	591086706
【住所又は居所】	神奈川県川崎市宮前区東有馬 1 丁目 3 番地 16
【氏名又は名称】	軽部 征夫

## 【代理人】

申請人

【識別番号】	100102978
【住所又は居所】	茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階 清水国際特許事務所
【氏名又は名称】	清水 初志

## 【選任した代理人】

【識別番号】	100108774
【住所又は居所】	茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階 清水国際特許事務所
【氏名又は名称】	橋本 一憲

次頁無

【書類名】 出願人名義変更届

【整理番号】 SEN-A0204

【提出日】 平成14年10月 2日

【あて先】 特許庁長官殿

【事件の表示】

【出願番号】 特願2002-259889

【承継人】

【識別番号】 502324011

【氏名又は名称】 矢野 和義

【承継人】

【識別番号】 591086706

【氏名又は名称】 輕部 征夫

【承継人】

【識別番号】 501218566

【氏名又は名称】 学校法人片柳学園

【承継人代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【承継人代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 4,200円

【プルーフの要否】 要

## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-259889
受付番号	50201483323
書類名	出願人名義変更届
担当官	伊藤 雅美 2132
作成日	平成14年12月 3日

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

## 【承継人】

【識別番号】	502324011
【住所又は居所】	東京都世田谷区北沢1-12-6
【氏名又は名称】	矢野 和義

## 【承継人】

【識別番号】	591086706
【住所又は居所】	神奈川県横浜市青葉区美しが丘2-54-10
【氏名又は名称】	軽部 征夫

## 【承継人】

【識別番号】	501218566
【住所又は居所】	東京都八王子市片倉町1404番1号
【氏名又は名称】	学校法人片柳学園

## 【承継人代理人】

申請人	
【識別番号】	100102978
【住所又は居所】	茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 清水国際特許事務所
【氏名又は名称】	清水 初志

## 【承継人代理人】

【識別番号】	100108774
【住所又は居所】	茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 清水国際特許事務所
【氏名又は名称】	橋本 一憲

次頁無

【書類名】 出願人名義変更届

【整理番号】 SEN-A0204

【提出日】 平成15年 5月12日

【あて先】 特許庁長官殿

【事件の表示】

    【出願番号】 特願2002-259889

【承継人】

    【識別番号】 301021533

    【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所

【承継人代理人】

    【識別番号】 100102978

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 清水 初志

【承継人代理人】

    【識別番号】 100108774

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 041092

    【納付金額】 4,200円

【プルーフの要否】 要

## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-259889
受付番号	50300778177
書類名	出願人名義変更届
担当官	塩原 啓三 2404
作成日	平成 15 年 7 月 1 日

## &lt; 認定情報・付加情報 &gt;

## 【承継人】

【識別番号】	301021533
【住所又は居所】	東京都千代田区霞が関 1-3-1
【氏名又は名称】	独立行政法人産業技術総合研究所

## 【承継人代理人】

申請人

【識別番号】	100102978
【住所又は居所】	茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階 清水国際特許事務所
【氏名又は名称】	清水 初志

## 【承継人代理人】

【識別番号】	100108774
【住所又は居所】	茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階 清水国際特許事務所
【氏名又は名称】	橋本 一憲

特願 2002-259889

出願人履歴情報

識別番号

[591086706]

1. 変更年月日 1991年 4月26日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 神奈川県川崎市宮前区東有馬1丁目3番地16  
氏 名 軽部 征夫
2. 変更年月日 2002年 9月 6日  
[変更理由] 住所変更  
住 所 神奈川県横浜市青葉区美しが丘2-54-10  
氏 名 軽部 征夫

特願 2 0 0 2 - 2 5 9 8 8 9

出 願 人 履 歷 情 報

識別番号

[ 5 0 2 3 2 4 0 1 1 ]

1. 変更年月日

2 0 0 2 年 9 月 5 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都世田谷区北沢 1 - 1 2 - 6

氏 名

矢野 和義



特願 2 0 0 2 - 2 5 9 8 8 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 5 0 1 2 1 8 5 6 6 ]

1 . 変更年月日

2 0 0 1 年    5 月 3 1 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都八王子市片倉町 1 4 0 4 番 1 号

氏 名

学校法人片柳学園

特願 2 0 0 2 - 2 5 9 8 8 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 3 0 1 0 2 1 5 3 3 ]

1. 変更年月日

2 0 0 1 年 4 月 2 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区霞が関 1 - 3 - 1

氏 名

独立行政法人産業技術総合研究所